

ラット Thy-1 抗原：その免疫化学的同定と ラットリンパ造血組織における発現の意義

上 出 利 光

札幌医科大学脳神経外科講座 (主任 佐藤 修教授)

石 井 良 文

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉教授)

Rat Thy-1 antigen: Immunochemical Characterization and Expression on Rat Lympho-Hematopoietic Cells

Toshimitsu UEDE

*Department of Neurological Surgery, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. O. Sato)*

Yoshifumi ISHII

*Department of Pathology (Section I), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. K. Kikuchi)*

Xenoantiserum highly specific for rat Thy-1 antigen (ABS) was prepared by immunizing rabbits with partially purified rat brain Thy-1 antigen. This antiserum reacted with majority of rat thymocytes, approximately 30% of bone marrow cells and 10% of spleen cells. When anatomical localization of ABS-reacted cells within the rat thymus was examined by immunoperoxidase staining, thymocytes located in the thymic cortex were intensely stained. Electron microscopic observations were made on bone marrow cells, and Thy-1 antigen was detectable on lymphocytic and immature blast cells, but not on mature nucleated erythrocytes and granulocytes containing peroxidase-positive cytoplasmic granules. We used the radioimmunoprecipitation technique and reacted ABS with various rat lymphoid cell lysates that had been labeled by sodium ^3H -borohydride after periodate oxidation and by lactoperoxidase catalyzing ^{125}I -iodination. SDS-PAGE analysis of the immunoprecipitates showed that ABS reacted with a 24,000–27,000 mol. wt. component from rat thymus and bone marrow cell lysates, that could be bound to a Sepharose-4B column coupled with Lens culinaris hemagglutinin and that could be labeled by sodium ^3H -borohydride, suggesting that it is a sialoglycoprotein. The immunological function of Thy-1 positive spleen cells was investigated and it was found that Thy-1 was expressed on NK cells as well as on precursor cells of Con A activated suppressor cells but not on cells responding in a allogeneic mixed lymphocyte interaction.

(Received September 12, 1980 and Accepted October 27, 1980)

1 緒 言

中枢神経系は従来免疫学的監視機構の及ばない immunologically privileged site¹⁾と考えられていたが、完全なものではなく免疫学的監視機構の影響をうけていることが明らかとなってきた^{2~4)}。さらに生体のホメオスターシスの維持の一翼をになう免疫機構は生体の統御機構である神経系、内分泌系と密接に関係して作用していることが明らかにされつつある^{5,6)}。これらの事実は脳と胸腺に共通抗原が存在するという報告^{7,8)}とあいまって興味ぶかい。この共通抗原である Thy-1 抗原はマウスでは T リ

ンパ球全般のマーカーとして存在する⁹⁾けれども、ラットにおける Thy-1 抗原はマウスと異なる組織分布を示し¹⁰⁾、T リンパ球の特定の亜群に存在するばかりでなく、骨髄の造血幹細胞や、B リンパ球の前駆細胞にも分布していることが明らかになってきている^{11~13)}。著者らはラット脳組織より部分精製した Thy-1 抗原をウサギに免疫して得た抗 Thy-1 抗血清を用いて、ラットリンパ造血組織における Thy-1 抗原の分布と Thy-1 抗原陽性脾細胞の免疫学的機能につき検討した。さらに Thy-1 抗原の免疫化学的性状について検討を加えた。

2 実験方法

2.1 実験動物

Wistar-King-Aptekman (WKA) 系および ACI 系の近交系ラットおよび C57BL/6 系および AKR 系の近交系マウス 2~3 カ月の雌雄の成体を用いた。

2.2 抗血清

Barclay *et al.*¹⁰⁾ の方法に準じてラット脳 Thy-1 glycoproteins を部分精製した。脳組織ホモジネートを 10,000 G 30 分間遠心し上清をさらに 100,000 G 1 時間遠心し膜分画を得た。膜ペレットをホモジナイザーで処理後、Lowry 法¹⁴⁾ にて蛋白量を測定し 12 mg/dl の濃度に phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 に浮遊した。等量の 4% Lubrol PX (半井化学, 京都) を加えた後 4°C にて 12 時間撹拌し、100,000 G 1 時間遠心後ペレットを PBS に浮遊し 1% Sodium deoxycholate (DOC: Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) を等量加えた。混合物を 4°C 1 時間撹拌してから 100,000 G 1 時間遠心し上清を集めた。Lens culinaris hemagglutinin を結合させた Sepharose-4B カラム (LcH: Pharmacia Fine Chemicals) をあらかじめ PBS に溶解した 0.5% DOC にて平衡状態に維持し、前述の上清を加えた。カラムに結合した糖蛋白を 0.2% DOC 溶液に溶解した 4% α -methyl-D-mannoside (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) を加え溶出した¹⁵⁾。溶出した糖蛋白を Sephadex G-150 でゲル分画を行い、分子量 2 万から 5 万の分画を集め、蛋白量が 400 μ g/ml になるよう調節した。ウサギを 400 μ g の糖蛋白で 2 週間毎 7 回免疫した。最初の 3 回は Freund's complete adjuvant とともに筋肉内に注射し、他の 4 回は Freund's incomplete adjuvant とともに皮下に注射した。最終免疫より 5 日後に全採血し、56°C 30 分間処理し非働化した。血清をラット赤血球と Syngeneic sarcoma cells にて 1:1 の容量で 1 回 4°C 30 分間吸収した。この抗血清を抗ラット脳 Thy-1 血清 (ABS) として使用した。特異性に関しては一部既に報告している¹⁶⁾。

2.3 培養液と細胞浮遊液

培養液は RPMI 1640 (Gibco Laboratories), 10% FBS (Fetal bovine serum; Flow Laboratories), penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 μ g/ml, pH 7.2 に調節した。胸腺, 脾臓, リンパ節をハサミで小片に細切し、これを 2 枚のスライドガラス間にはさんで圧迫した後、200 mesh stainless steel screen を通した。骨髓細胞は両側大腿骨の両端を切断し、21 gage の注射針を用いて細胞を流し出し、上記 screen を通した。死細胞や赤血球は、Ficoll-Conray (d=1.090) 比重遠心法にて除去した。PBS で 3 回

洗浄し一定の細胞数に調整して PBS 又は培養液に浮遊した。

2.4 蛍光抗体法とペルオキシダーゼ酵素抗体法

細胞表面抗原と抗血清との結合を間接蛍光抗体法により検討した¹⁷⁾。2 次血清は Fluorescein isothiocyanate 結合抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Miles Laboratories) を用いた。5 \times 10⁶/ml になる様に PBS に浮遊した細胞浮遊液 100 μ l に 8 倍希釈の ABS 50 μ l を加え 4°C 30 分間反応後、冷 PBS で洗浄し、5 倍希釈 2 次血清を 50 μ l 加え 4°C 30 分間反応させた後冷 PBS で 3 回洗浄した。細胞をグリセリン PBS に浮遊させ、スライドガラスに包埋して Leitz Ortholux II 落射型蛍光顕微鏡にて膜蛍光陽性細胞数 (%) を調べた。

ペルオキシダーゼ酵素抗体法の場合にはクライオスタットで 4 μ m の厚さに胸腺の凍結切片を作整し、切片を冷 95% エタノールで 3 分間固定後乾燥してから 8 倍希釈 ABS で切片を被い、室温で 30 分間反応させた。その後冷 PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、次いで 20 倍希釈ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Miles Laboratories) で同様に反応を行った。切片を同様に PBS にて洗浄し、Graham and Karnovsky の方法¹⁸⁾ に準じてペルオキシダーゼ反応基質液 (0.01% H₂O₂ 加 3, 3'-diaminobenzidine 飽和液, pH 7.6) 中で 7 分間反応、発色させた。反応後冷 PBS で 3 回 5 分間ずつ洗浄後、核染色のために 0.2% メチルグリーン溶液で 1~2 分間染色し、ブチルアルコールで 3 回脱水し、キシロールで透徹、Bioleit で封入、観察に供した。

2.5 免疫電子顕微鏡の観察

骨髓細胞浮遊液と ABS を 4°C 30 分間反応させ、PBS で 2 回洗浄した。ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ血清で同様に反応させ洗浄した後 0.1 M リン酸緩衝液で pH 7.4 に調整した 2.5% グルタルアルデヒド液で 4°C 1 時間固定した。上述したごとくペルオキシダーゼ反応基質液で室温にて 1 時間発色させ 0.1 M リン酸緩衝液で 1 時間洗浄後、2% オスミウム酸で 2 時間後固定を行った。脱水のちエポン包埋、LKB ミクロトームで超薄切片を作製、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の 2 重染色の後、JEM-100C 透過型電子顕微鏡により観察を行った。

2.6 Protein A の ¹²⁵I による標識

Protein A (Pharmacia Fine Chemicals) の ¹²⁵I による標識はクロラミン T 法¹⁹⁾ により行った。25 μ g の Protein A と 10 μ g のクロラミン T に 0.5 mCi の Na ¹²⁵I (Radiochemical Center Ltd.) を加え室温にて 2 分間反応させた。反応は 250 μ g NaHSO₃ と 1 mg KI を加え停止させ、Sephadex G 50 カラムにて標識 Protein A を分離

した。

2-7 Antibody-binding inhibition assay

80 倍希釈の ABS 1 cc を 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 個の脾, 骨髓, リンパ節又は胸腺細胞で 4°C 30 分間吸収し, 1,000 G 2 分間遠心し上清を得た。100 μl の 80 倍希釈 ABS と 5×10^6 個/100 μl の胸腺細胞を 4°C 30 分間反応させ, PBS で 2 回洗浄後 20 ng の ^{125}I -Protein A を加え 4°C で 45 分間反応させ PBS で 2 回洗浄し, 細胞と結合した γ 線の放射線量を Packard gamma counter で測定した。この値を 100% とし, 種々の細胞で吸収した ABS と胸腺細胞との結合の値から次の式で吸収活性 (% inhibition) を求めた。

% inhibition =

$$\left(1 - \frac{\text{experimental cpm (absorbed serum)}}{100\% \text{ binding cpm}}\right) \times 100$$

2-8 細胞膜表面のシアル酸の ^3H による標識

細胞表面のシアル酸は Gahmberg and Andersson²⁰⁾ の方法に準じ periodate-tritiated borohydride により標識した。1 $\times 10^7$ 個の胸腺, 骨髓又はリンパ節細胞を 1 mM の過ヨウ素酸で 4°C 10 分間処理し, PBS にて 3 回洗浄後 1 ml の PBS に再浮遊した。これに 4 mCi の sodium ^3H -borohydride (Radiochemical Center Ltd.) を加え室温にて 30 分間反応を行った。1 mM の phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF: Sigma Chemical Co.) を含んだ PBS で 3 回洗浄し, 2% Lubrol PX を含む PBS 2 ml を加え 4°C 1 時間反応させ, 標識細胞膜を可溶化した。混合物を 4,000 G 30 分間遠心し, 上清を 1 mM PMSF を含んだ PBS に透析した後, ミリポアフィルターを通過させ, 後述する radioimmunoprecipitation (RIP) の実験に用いた。

2-9 細胞表面蛋白の ^{125}I による標識

1 $\sim 2 \times 10^8$ 個/ml の脾, 胸腺又は骨髓細胞に 100 μl の lactoperoxidase (2 mg/ml, Sigma Chemical Co.) と 1 mCi の Na ^{125}I を加えた²¹⁾。3 分間ごと 4 回 0.03% 過酸化水素水を 100 μl ずつ加えた。計 12 分間室温で反応させた後 250 G 10 分間遠心し, 50 ml の PBS にて洗浄後 1 ml の 2% Lubrol PX を含んだ PBS を加え, 4°C 1 時間反応させ標識細胞膜を可溶化した。4,000 G 15 分間遠心した上清をミリポアフィルターを通し, さらに LcH カラムに加えて標識糖蛋白を精製した。カラムに結合した標識糖蛋白を 4% α -methyl-D-mannoside で溶出した。溶出液を 0.2% Lubrol PX を含んだ PBS にて透析し, RIP の実製に用いた。

2-10 RIP とポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 万 cpm の標識細胞表面蛋白と 8 倍希釈の ABS 100 μl

を反応させた。対照群として 8 倍希釈の正常家兎血清を用いた。 37°C で 30 分間, 又はさらに 4°C で 20 時間反応後, 抗原抗体複合物に 10% Staphylococcus aureus Cowan I (The Enzyme Center Inc.) を 300 μl 加え 37°C 1 時間反応させ免疫沈降させた。沈降物を 0.2% Lubrol PX を含んだ PBS にて 3 回洗浄し, 5% 2-mercaptoethanol と 2% SDS を含んだ 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) の 200 μl に溶解し 4 分間 100°C の水槽の中で加熱した後 4,000 G 20 分間遠心し上清を 0.1% SDS-10% polyacrylamide tube gel (SDS-PAGE) で泳動した²³⁾。電気泳動は tube 当たり 3 mA で行い, bromophenol marker が gel の下端に達した所で終了した。染色は 0.025% Coomassie brilliant blue R-250, 45.4% methanol, 9% glacial acetic acid 混合溶液で室温で 20 時間行い, 脱色後 2 mm 間隔に切り Packard gamma counter にて ^{125}I の含有量を測定した。トリチウムの放射活性は NCS tissue solubilizer (Radiochemical Center Ltd.) で可溶化した後シンチレーション液 (トルエン 1 l, POP 4 g, PPOPO 0.1 g) を加え LKB 200 scintillation counter にて測定した。マーカー蛋白としては phosphorylase b (分子量 94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400) を用いた。

2-11 Thy-1 陽性細胞の除去

8 倍希釈の ABS 100 μl に 2×10^7 個の細胞を加え, 室温で 30 分間反応させた後培養液で洗浄し, 補体源として 2 倍希釈のモルモット血清 200 μl を加えた。 37°C 30 分間反応後培養液にて洗浄し, 一定の細胞数に培養液に浮遊させた。

2-12 NK (Natural Killer) 活性の測定

NK 活性の測定は ^{51}Cr release cytotoxicity assay にて行った。標的細胞は骨髓性白血病由来の K 562 を用いた。1 ml の PBS に 10^7 個の K 562 を浮遊させて Na $^{51}\text{CrO}_4$ (Radiochemical Center Ltd.) を 200 μCi 加え 37°C 45 分間 incubation 後, 培養液で 2 回洗浄し一定の細胞数に調節した。丸底の 96 well plastic plate (Nunc, Denmark) に 0.1 ml に 10^4 個の ^{51}Cr 標識標的細胞を浮遊して各 well に加え, 37°C 45 分間 incubation した。その後 0.1 ml の培養液に 10^6 個の脾細胞又は 10^6 個の Thy-1 陽性細胞除去脾細胞を effector cell として加えた。 37°C 18 時間 5% 炭酸ガス CO_2 incubator 内にて培養した。最大遊離は 1% Lubrol PX を加え, 自然遊離は培養液を加え, 培養した後 1,000 G 10 分間 plate を遠心し上清 0.1 ml を取り, 遊離放射活性を測定した。% specific lysis は以下のごとく計算した。

% specific lysis =

$$\frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

2.13 脾細胞の Con A による活性化

5×10^6 WKA 脾細胞を補体のみ、又は ABS と補体で処理し、5 ml の培養液に浮遊し 48 時間 $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度の Con A (Sigma Chemical Co.) の存在下で培養した。培養後 PBS にて洗浄し一定の細胞数に調整し培養液に浮遊した。

2.14 リンパ球混合培養 (MLC)

WKA ラット脾細胞を $50 \mu\text{g/ml}$ の Mitomycin C で 37°C 30 分間処理し PBS で 4 回洗浄し, stimulator cell として使用した。 28×10^4 stimulator cell と 14×10^4 ACI ラット脾細胞を responder cell とする One way MLC を行い、120 時間培養後 $0.5 \mu\text{Ci}$ ^3H -thymidine を加え 136 時間目に Marsh II harvester で glass wool filter 上に細胞を回収した。放射線活性は liquid scintillation counter にて測定した。

3 結 果

3.1 Thy-1 抗原の組織分布

間接蛍光抗体法を用いてラットリンパ組織における Thy-1 抗原の分布を検討した。Table 1 に示すごとく、ABS はラット胸腺細胞の大部分と反応し、骨髄細胞の 35%、脾細胞の 11%、リンパ節細胞の 3% と反応した。ラ

Table 1 Distribution of Thy-1 antigen in rat and mouse tissue

	Rat	Mouse	
		AKR	C 57 BL
Thymus	91.5%	99.0%	98.6%
Bone Marrow	34.6%	2.0%	0.0%
Spleen	11.2%	31.5%	32.2%
Lymph Node	2.5%	63.8%	62.5%

ット胸腺内における抗原分布をペルオキシダーゼ酵素抗体法により検討したが、Fig. 1 のごとく、皮質の胸腺細胞には Thy-1 抗原が強く表現されていたが髄質の細胞は陰性であった。骨髄の Thy-1 抗原陽性細胞の形態学的特徴を明らかにする目的で免疫電子顕微鏡的観察を行った。骨髄のリンパ球様細胞の多くは Thy-1 抗原陽性であった (Fig. 2)。大きな円形の核と 1~2 個の著明な核小体を有し少数のミトコンドリアと多数の遊離リボソームを細胞質内に有する大型の blastic cell も陽性であった。有核赤血球やペルオキシダーゼ陽性細胞質内顆粒を有する顆粒球系細胞は Thy-1 抗原陰性であった (Fig. 3)。

ABS とマウスリンパ球表面抗原との交叉反応につき検討した (Table 1)。マウス胸腺細胞の 100%、リンパ節細胞の 60%、脾細胞の 30% は Thy-1 抗原陽性でありアロ抗 Thy-1 血清の結果と同様であった²⁴⁾。ABS はマウスにお

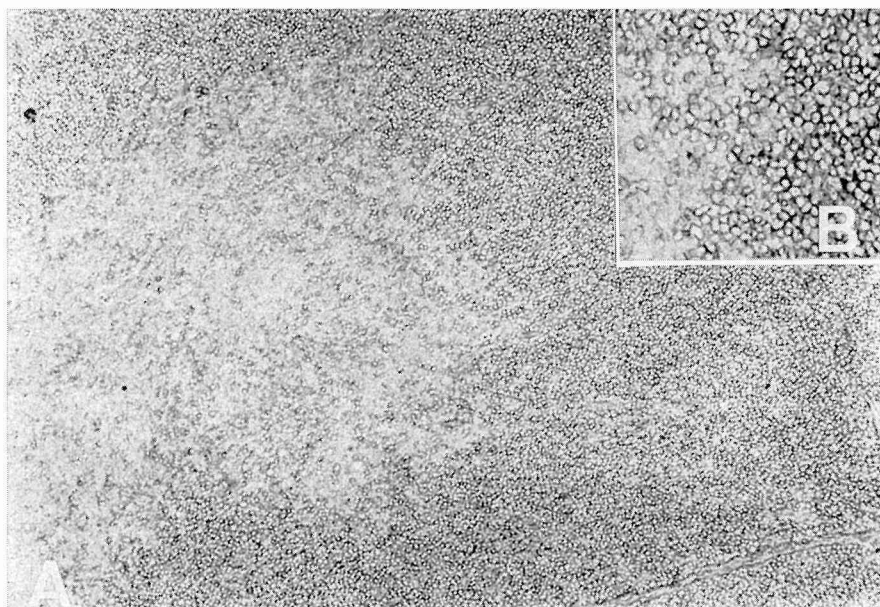


Fig. 1 Immunoperoxidase staining of rat thymus section with ABS, which reacts intensely with thymus cells in the cortex. A: $\times 108$. B: $\times 400$.

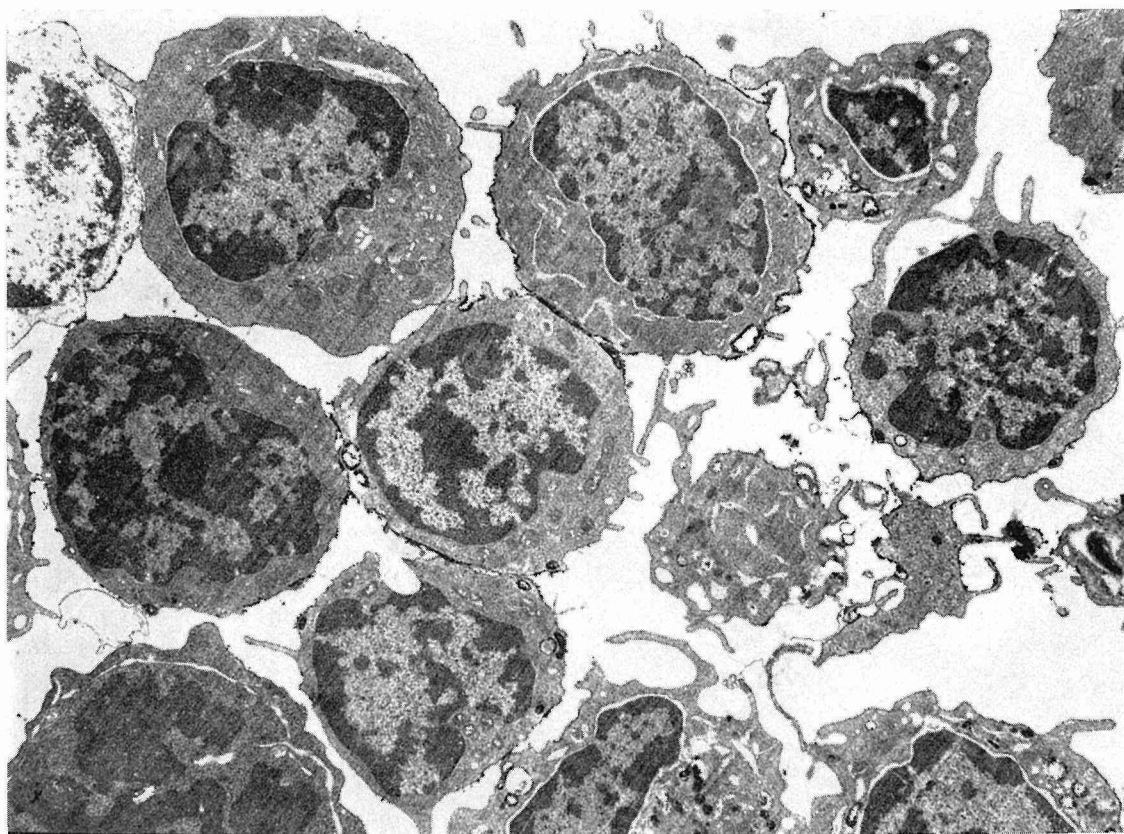


Fig. 2 Lymphocytic cells in rat bone marrow possessing Thy-1 antigen on their cell surfaces. Black reaction products indicate the presence of Thy-1 antigen. ($\times 38,000$).

ける Thy-1.1 (AKR) と Thy-1.2 (C57BL) の allogenic difference を認識することはできなかった。ラットにおける結果との大きな差はラット末梢リンパ球の大多数は Thy-1 陰性であるのに対しマウスでは多くが陽性であること、マウスの骨髓細胞中にはラットとは逆にほとんど陽性細胞を認めず 2% 以下の陽性率であったことである。

3.2 Antibody-binding inhibition assay

種々のリンパ造血系細胞にて ABS を吸収することによりどの程度胸腺細胞と ABS との反応を抑制できるかにより各種リンパ造血組織における Thy-1 抗原量を, ^{125}I -protein A を用いた定量吸収試験によって検討した (Fig. 4)。胸腺細胞による吸収が一番少い細胞数で高い抑制を示し、次いで骨髓細胞、脾細胞の順序となる。リンパ節細胞による吸収は、細胞数を増加させても抑制率にほとんど変化を認めない。抑制効果により各臓器細胞の平均抗原量を推定すると、胸腺細胞は骨髓細胞の 10 倍、脾細胞の 50 倍の抗原を有し、Thy-1 陽性細胞は胸腺 96、骨髓 30、脾 10% であるから、陽性細胞当りの抗原量は胸腺を 1 とすると骨

髄 1/3、脾 1/5 となる。

3.3 ABS による認識される抗原の性状

3.3.1 ラットリンパ球表面抗原

ラクトペルオキシダーゼの触媒作用により ^{125}I で標識した胸腺細胞膜糖蛋白 lysate と ABS の免疫沈降物を SDS-PAGE にて分析した。標準蛋白との相対的移動度から算出した分子量 27,000 の部分に放射線活性の peak を認めた (Fig. 5a)。同様の peak が過ヨウ素酸塩を用いて ^3H 標識水酸化ホウ素ナトリウムで標識した胸腺細胞膜 lysate と ABS の免疫沈降物からも得られた (Fig. 5b)。

同様の実験をラット骨髓細胞について行った。前述のごとく ^3H で標識した骨髓細胞 lysate と ABS の免疫沈降物を SDS-PAGE で分析した。37°C 1 時間の免疫反応時間では、明らかな peak は得られないが、さらに 4°C 20 時間の沈降反応を行い SDS-PAGE を行くと、分子量 24,000 の部分に明瞭な peak が認められた (Fig. 6)。ラクトペルオキシダーゼ触媒による骨髓細胞の ^{125}I 標識糖蛋白と ABS の免疫沈降物からは同様の条件で明らかな peak は認めら

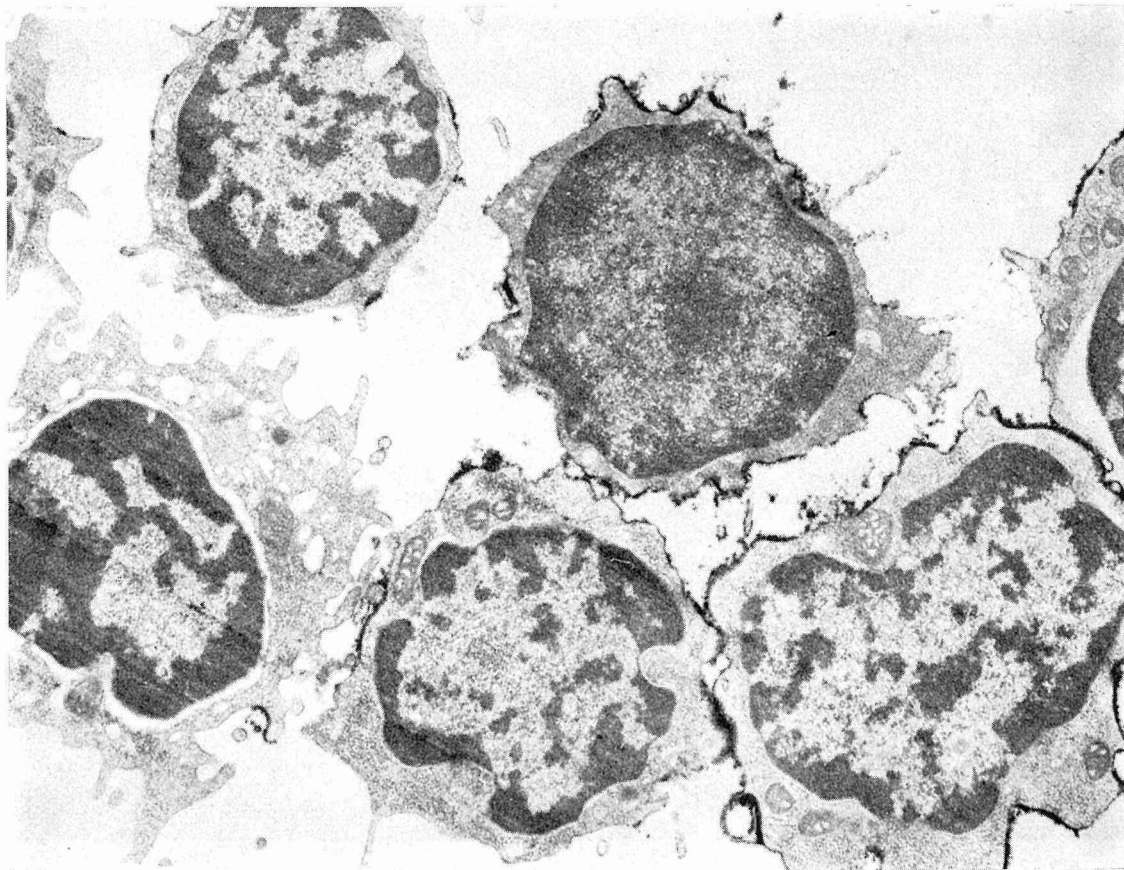


Fig. 3 Large blastic cells bearing Thy-1 antigen. Granulocytic cells possessing peroxidase-positive cytoplasmic granules are not stained with ABS. ($\times 38,000$).

れなかった。

種々のリンパ組織の細胞に ABS により認識される抗原が同一の抗原かどうかの確認のために、標識胸腺細胞膜より得られた分子量 27,000 の peak が、種々の組織で ABS を吸収した場合どの様に変化するかを検討した (Fig. 7). ABS を脳ホモジネート、胸腺細胞で 1:1 の容量で吸収し、 ^3H 標識胸腺細胞膜 lysate と反応させた場合、分子量 27,000 の peak は認められなかった。骨髓細胞も吸収活性をもつが、胸腺細胞や脳ホモジネートに比較してより多くの細胞数を必要とした。脾細胞にも弱いながら吸収活性は認められるが、肝、リンパ節細胞には認められなかった。ABS により骨髓細胞により認識される分子量 24,000 の抗原と、胸腺細胞に認識される 27,000 の分子量の抗原の関係を明らかにするために、ABS をリンパ節細胞で吸収し、上清を ^3H 標識骨髓細胞 lysate と反応させたところ (Fig. 8), 分子量 24,000 の peak は変化しなかった。脳ホモジネートや胸腺細胞で吸収すると 24,000 の peak は吸収された。

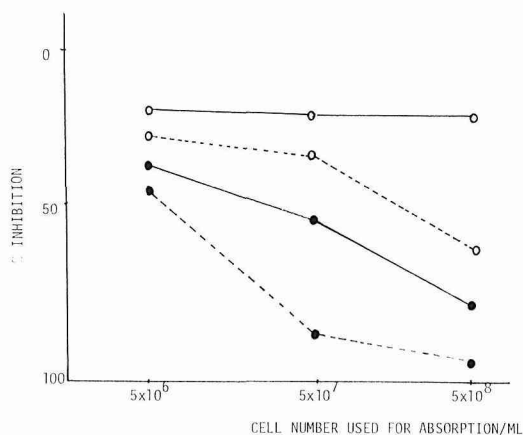


Fig. 4 Comparative absorption of ABS by rat thymocytes, bone marrow cells, spleen cells and lymph node cells. After absorption, residual binding activity to rat thymocytes was assayed by using ^{125}I -labeled protein A. Cells used for absorption: lymph node cells (○—○), spleen cells (○···○), bone marrow cells (●—●), and thymocytes (●···●).

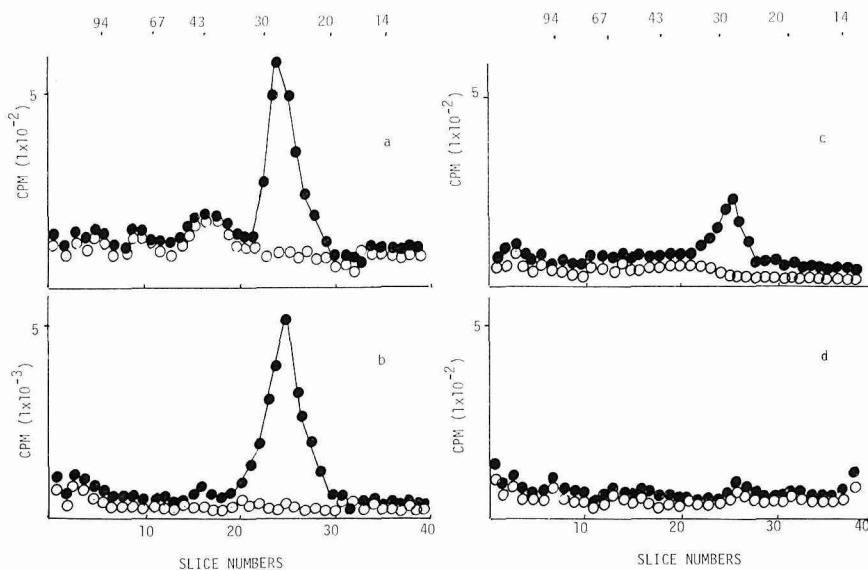


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ABS and rat thymus glycoproteins labeled either ^{125}I by lactoperoxidase (a), or with ^3H by periodate-sodium borohydride (b). SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ABS and mouse thymus glycoproteins labeled either with ^{125}I by lactoperoxidase (c), or ^3H by periodate-sodium borohydride (d).

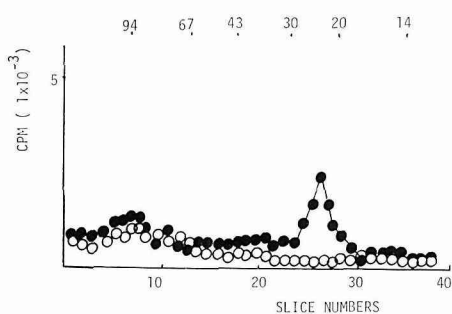


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between ABS and rat bone marrow cell lysate labeled with ^3H .

3・3・2 マウスリンパ球表面抗原

C 57 BL マウスの胸腺細胞をラクトペルオキシダーゼにより ^{125}I で標識し可溶化した後 LcH カラムにて糖蛋白分画を得て ABS との免疫沈降物を SDS-PAGE で解析したところ分子量 25,000 の peak を得た。この結果はマウス Thy-1 抗原の特徴と一致している^{25,26)}。この分子量 25,000 の抗原は過ヨウ素酸塩による ^3H の標識では効果的にラベルされなかった (Fig. 5)。

3・4 Thy-1 抗原陽性脾細胞の免疫学的機能

3・4・1 MLC に対する影響

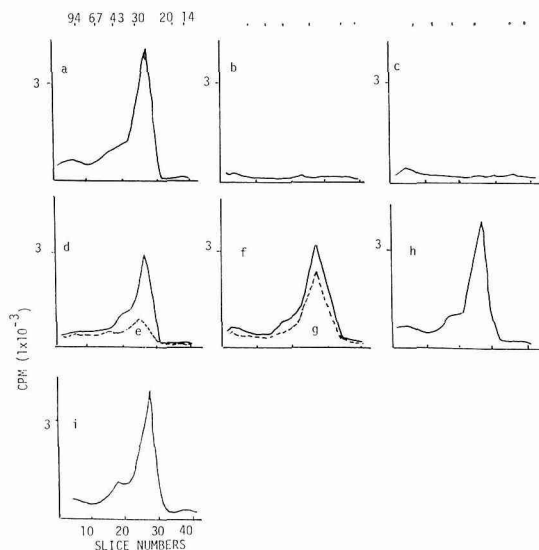


Fig. 7 Immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis of ^3H labeled rat thymus cell lysate reacted with ABS either unabsorbed (a) or absorbed once (b-d, f, h, i) or twice (e, g) with equal volume of brain homogenate (b), thymocytes (c), bone marrow cells (d, e), spleen cells (f, g), liver homogenates (h), lymph node cells (i).

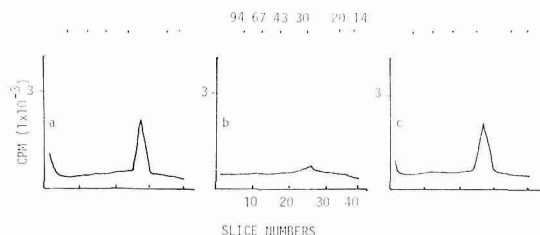


Fig. 8 Immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis of ^3H labeled rat bone marrow cell lysate reacted with ABS either unabsorbed (a) or absorbed once with equal volume of thymocytes (b) and lymph node cells (c).

Table 2 Effect of Anti-Thy-1 treatment of spleen cells on their MLC reactivity

MLC combination	Treatment	
	C* alone	Anti-Thy-1 + C
S ¹ (ACI)-R ² (ACI)	370 (1.00) ³	nd ⁴
S (WKA)-R (ACI)	47,568 (128.6)	56,272 (152.3)

*C: Complement.

¹S: Stimulator cells.

²R: Responder cells.

³Values were expressed as cpm and S. I. were in parentheses.

⁴nd: not determined.

WKA ラット脾細胞を stimulator cell として ACI ラット脾細胞を responder cell とする One way MLC は, responder cell を補体処理してもまったく影響はうけず, ABS と補体処理により Thy-1 陽性脾細胞を除去した場合でもその MLC 反応には影響はなかった (Table 2).

3.4.2 Con A 誘導サプレッサー細胞との関係

One way MLC に Con A で誘導したサプレッサー細胞を加えると MLC 反応が著明に抑制された. この抑制は加えるサプレッサー細胞の数が増加するにつれてつよい抑制を示した. Thy-1 陽性脾細胞群を ABS と補体処理により除去してから, Con A により賦活化した脾細胞を MLC に加えると MLC 反応の抑制効果は消失し, 逆に反応の増強が観察された (Fig. 9).

3.4.3 NK 細胞との関係

WKA ラットの脾細胞は K562 細胞に対して NK 活性を示し, 脾細胞の補体処理にはまったく影響をうけないが, WKA ラット脾細胞中より Thy-1 陽性脾細胞を除去すると NK 活性が著明に低下する現象が認められた. 又抗 T 細胞血清²⁷⁾ と補体処理により T 細胞を除去しても, NK 活性が低下した (Table 3).

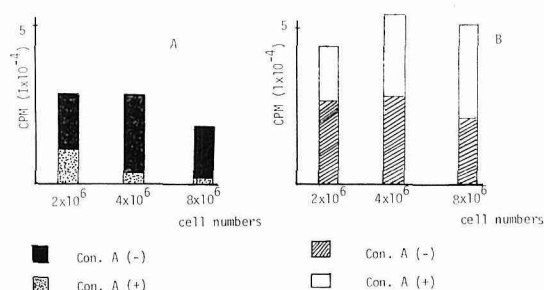


Fig. 9 Effect of Con A activated WKA spleen cells pretreated either with ABS and C (B) or with C alone (A) on one-way MLC. Suppression of MLC responses were noted by adding Con A activated spleen cells. When Thy-1 positive spleen cells were depleted by treating them with ABS and C before Con A activation, their suppressor activity on MLC were abolished.

Table 3 Effect of Anti-Thy-1 treatment of spleen cells on their NK activity

Treatment	T/E ratio	% Cytotoxicity (SE) ¹
C alone ²	1:100	17.80 (7.69) ³
Anti-Thy-1 + C	1:100	-0.57 (1.26)
Anti-T + C	1:100	1.53 (4.00)

¹SE: Standard error.

²C: Complement.

³All data presented were from triplicate determination and standard error were in parentheses.

4 考 按

マウス Thy-1.1 に対するアロ抗血清はラット Thy-1 抗原と交叉反応することは知られているが²⁸⁾, RIP と SDS-PAGE による解析ではアロ抗血清はラットリンパ球上の Thy-1 抗原を沈降させることはできなかった. したがって著者らはラット脳より精製した Thy-1 glycoproteins をウサギに免疫して抗 Thy-1 抗体 (ABS) を作製し, ラットリンパ球上の抗原について検討した. 蛍光抗体法において ABS とラットリンパ球との反応を検討した結果は大部分の胸腺細胞と反応し, 骨髄細胞の 35%, 脾細胞の 11% と反応するがリンパ節細胞とはほとんど反応せず, この結果は抗 Thy-1.1 アロ血清を用いての細胞障害試験や radioactive binding assay で得た結果²⁸⁻³⁰⁾ と同様で ABS が Thy-1 抗原を検出していることが示された. 胸腺細胞, 骨髄細胞, 脾細胞間の Thy-1 抗原陽性細胞の抗原量を比較してみると, 胸腺細胞は骨髄細胞の 3 倍, 脾細胞の 5 倍を

有している。

ラット胸腺内における抗原分布は胸腺皮質細胞に強く Thy-1 抗原が表現されている。同様の分布を示す抗原は Goldschneider³¹⁾ により骨髓リンパ球に対するウサギ抗血清 (BMLA) により認識されることが報告されており、この関係からも今回我々が免疫電顕により骨髓リンパ球の大部分が Thy-1 抗原をその細胞表面に表現していることを明らかにしたことは注目に値する。Goldschneider³²⁾ は BMLA と Thy-1 抗原が各々の抗血清により両者が Co-capping をおこすことより同一分子上に存在していると考えているが、その確認には免疫化学的分析が必要であろう。

現在のところマウス T リンパ芽球細胞²⁶⁾、マウス脳³³⁾、ラット胸腺³⁴⁾、ラット脳¹⁰⁾ より Thy-1 抗原が分離されている。その免疫化学的性状に関しては、ラット脳の Thy-1 抗原、ラット胸腺の Thy-1 抗原 (このうち胸腺の Thy-1 抗原は LeH カラムに結合するものと、しないものがある) の 3 つの型が報告されている^{3,10)}。しかし骨髓の Thy-1 抗原に関する報告はない。著者らは ABS と標識骨髓細胞の免疫沈降物より SDS-PAGE により分子量 24,000 の抗原を認識した。ABS は胸腺細胞より分子量 27,000 の Thy-1 抗原を認識しているわけであるが、この分子量のわずかに異なる 2 つの component は同一の抗原であると考えられる。その理由として第 1 に ABS を骨髓細胞で吸収した場合、胸腺細胞から 27,000 の抗原を検出できない。第 2 に ABS を胸腺細胞で吸収した場合、骨髓細胞から分子量 24,000 の抗原を検出できない。第 3 に ABS を脳で吸収した場合、胸腺細胞から 27,000、骨髓細胞から 24,000 の抗原を検出することはできなかった。しかもラットリンパ組織における Thy-1 抗原は SDS-PAGE で解析する場合、脳の Thy-1 抗原と胸腺の Thy-1 抗原に関しても分子量に差異のあることはすでに報告されている^{3,10)}。Standring *et al.*³⁵⁾ は、ラット胸腺細胞を ³H でラベルし可溶化し PAGE 分析を行ったところ分子量 25,000 のところに band を認めたが、骨髓細胞からは同様の実験で band を得られなかったと報告している。著者らの実験では ABS と標識骨髓細胞 lysate との免疫沈降反応を 37°C 1 時間行い SDS-PAGE 分析を行った場合明瞭な peak は認められなかったが、さらに 4°C 20 時間の免疫沈降反応を行い、SDS-PAGE 分析を行ったところ分子量 24,000 の抗原を認識することができた。分子量 24,000 の peak が非特異的反応産物でないことはリンパ節細胞で ABS を吸収してから標識骨髓細胞と免疫沈降反応を行っても 24,000 の peak は消失しないが、胸腺細胞や脳ホモジネートで吸収すると消失することからも明らかである。おそらく骨髓細胞の抗原量が少く、認識しうる免疫沈降物を得るのに長時間の

incubation が必要なのであろう。従来マウス Thy-1 抗原がラベルされる条件でラット Thy-1 抗原はラクトペルオキシダーゼ触媒により ¹²⁵I でラベルされないと報告されているが^{35,36)}、著者らの検討では、ラット胸腺 Thy-1 抗原は ¹²⁵I により標識することができた。ラット Thy-1 抗原分子には 2 個のチロシン残基が存在することや²⁸⁾、精製されたラット Thy-1 抗原はクロラミン T 法により ¹²⁵I でラベルされる³⁵⁾ ことから当然と考えられる。しかし骨髓細胞の Thy-1 抗原が ¹²⁵I でラベルされなかったことに関しては、胸腺と骨髓細胞上の Thy-1 抗原のチロシン残基に高次構造上の差が存在するか、骨髓細胞上のチロシン残基が mask されている状態で存在している可能性がある。これに反しマウス Thy-1 抗原は過ヨウ素酸塩を用いた sodium ³H-borohydride では標識することはできなかった。これはラットにおいても胸腺と脳の Thy-1 抗原分子の carbohydrate composition に大きな差が存在し³⁷⁾、ラットとマウス間ではさらに大きな差が存在することが推測される。

ラット Thy-1 抗原の免疫化学的分析に比し Thy-1 抗原保有細胞の免疫学的機能に関する研究は少ない。マウスにおける Thy-1 陽性細胞の免疫学的機能に関する研究³⁸⁻⁴⁰⁾ は、マウスにおける Thy-1 抗原が general T cell marker としての性格を有していることを示しており、ラットにおける Thy-1 抗原が T 細胞亜群を認識しているのとは大きく異なっている。本研究において、ラットにおける Con A 誘導抑制性 T 細胞および NK 細胞が Thy-1 抗原を有していることを明らかにした。従来 NK 細胞の特徴として non-phagocytic, non-adherent, surface Ig 陰性、補体レセプター陽性という点が挙げられているが、確実なマーカーが存在しないことから NK 細胞の性状、起源に関しては十分解明されているとはいえない。Cantor *et al.*⁴¹⁾ はマウスの NK 細胞が T 細胞分化抗原である Ly-5 フロ抗原を有していると報告している。また NK 細胞は pre-thymic T 細胞であり、マウスの場合 low density ながら Thy-1 抗原を有しているとの報告もあり⁴²⁾、NK 細胞が T 細胞群に属しているとの考えもあるが反論も多い。最近マウス NK 活性がマウス脳ホモジネートセウサギを免疫して得た血清 anti-brain associated T cell antigen (anti-BAT) にて除去されることが明らかとなり⁴³⁾、さらに anti-BAT 血清の抗 NK 活性は神経起源の glycolipids である asialo GM₁ により特異的に吸収され⁴⁴⁾、Schwartz and Summers⁴⁵⁾ が遺伝的に NK 活性が欠落している C57 BL/6 bg/bg (beige) というマウス脾細胞では asialo GM₁ 含有量が著明に低下していることをみだし、asialo GM₁ がマウス NK 細胞のマーカーとして注目されてきて

いる。しかしながらラット NK 細胞に関して確実なマーカーが報告されていない現状で、Thy-1 抗原とラット NK 細胞との関連は NK 細胞の性状、起源を明らかにするうえで重要であろう。また我々が従来より使用している抗ラット T 細胞血清も NK 活性を障害したが、本血清がマウス Ly-5 に近似の T 細胞抗原に対する抗体を含んでいる可能性もあり、今後の検討が必要と思われる。

リン造血系細胞の個体発生は非常に興味深い問題であるが、ラットの骨髓細胞の約 30% が Thy-1 抗原を有していること^{11-13, 32, 46)}と関連して Hunt¹²⁾は致死量の放射線照射ラットに Thy-1 陰性の骨髓細胞を移入した場合 donar 由来 B リンパ球は出現せず、Thy-1 陽性の骨髓細胞を移入した場合に donar 由来 B リンパ球が出現することを報告し per-B リンパ球に Thy-1 抗原が分布していることを見出した。又 Thierfelder³⁰⁾はラットの顆粒球幹細胞、Goldschneider³²⁾はより未熟な多能性幹細胞にも Thy-1 抗原が分布していることを明らかにし、ラットの Thy-1 抗原は T リンパ球亜群のマーカーとしてばかりでなく、ラット造血幹細胞のマーカーとして造血幹細胞の個体発生を明らかにする上で重要となってきた。この意味からも我々が免疫電顕においてリンパ球様細胞や大型 blast cell に Thy-1 抗原が分布していることを明らかにしたことは細胞分化の過程を解明する手がかりになると考える。我々の今回の研究および上述したような事実を考え併せると、マウスでは Thy-1 抗原が per-T から Thymocyte に分化する過程で増量するという T 細胞マーカーとして出現するのに対し、ラットでは Thy-1 抗原はむしろ造血幹細胞からリンパ系、顆粒球系細胞の分化の初期段階に主に発現し、T 細胞系では胸腺内分化の特定の過程まで発現していると考えることができよう。しかしその発現の意義や種族間におけるこのような発現様式の差異などの意味については今後の研究にまたねばならない。

5 結 語

ラット Thy-1 抗原の分布、免疫化学的性状、免疫学的機能につき検討し、以下の結果を得た。

1) 大部分の胸腺細胞、骨髓細胞の 30%、脾細胞の 10% に Thy-1 抗原が分布しているが、リンパ節細胞にはほとんど分布していない。

2) 組織内分布は、胸腺皮質細胞に強く分布しており骨髓内ではリンパ球様細胞と大型の blast cell に分布している。しかし有核赤血球やペルオキシダーゼ顆粒を有する顆粒球系細胞にはみられず骨髓における造血細胞分化の初期に出現する抗原と考えられた。

3) ラット胸腺の Thy-1 抗原は SDS-PAGE による分

析では 27,000 の分子量をもち、ラクトペルオキシダーゼ触媒による ¹²⁵I の標識、過ヨウ素酸塩による ³H の標識も可能であった。このことはラットの Thy-1 が sialoglycoprotein であることを示している。

4) ラット骨髓の Thy-1 抗原は SDS-PAGE による分析では 24,000 の分子量をもち、過ヨウ素酸塩による ³H の標識が可能であった。

5) Thy-1 抗原は NK 細胞や Con A 誘導サプレッサー細胞の前駆細胞に分布していたが、MLC 反応細胞にはなく、ラットリンパ球亜群を認識する有用なマーカーと考えられた。

文 献

1. Green, H. S. N.: Heterotransplantation of tumors. *Ann. NY. Acad. Sci.* **69**, 818-829 (1957).
2. Scheinberg, L. C., Edelman, I. L. and Levy, W. A.: Is the brain "an immunologically privileged site"? I. Studies based on intracerebral tumor homotransplantation and isograft transplantation to sensitized host. *Arch. Neurol.* **11**, 248-264 (1964).
3. Scheinberg, L. C., Levy, W. A. and Edelman F. A.: Is the brain "an immunologically privileged site"? II. Studies in induced host resistance to transplantable mouse glioma following irradiation of prior implants. *Arch. Neurol.* **13**, 283-286 (1965).
4. Scheinberg, L. C., Kotsilimbas, D. G., Karpf, R. and Mayer, N.: Is the brain "an immunologically privileged site"? III. Studies based on homologous skin grafts to the brain and subcutaneous tissues. *Arch. Neurol.* **15**, 62-67 (1966).
5. Basedovsky, H. O. and Sorkin, E.: Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol.* **27**, 1-12 (1977).
6. Basedovsky, H. O., Rey, A. D., Sorkin, E., Prada, M. D. and Keller, H. H.: Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* **48**, 346-355 (1977).
7. Reif, A. E. and Allen, J. M. V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous system. *J. Exp. Med.* **120**, 413-433 (1964).
8. Douglas, T. C.: Occurrence of a thetalike antigen in rats. *J. Exp. Med.* **136**, 1054-1062 (1972).
9. Morris, R. J. and Williams, A. F.: Antigens on mouse and rat lymphocytes recognized by rabbit antiserum against rat brain: The quantitative analysis of a xenogenic antiserum. *Eur. J. Immunol.* **5**, 274-281 (1975).

10. Barclay, A. N., Letarte-Muirhead, M. and Williams, A. F.: Purification of Thy-1 molecule from rat brain. *Biochem. J.* **151**, 699-706 (1975).
11. Hunt, S. V., Mason, D. W. and Williams, A. F.: In rat bone marrow Thy-1 antigen is present on cells with membrane immunoglobulin and on precursors of peripheral B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **7**, 817-823 (1977).
12. Hunt, S. V.: The presence of Thy-1 on the surface of rat lymphoid stem cells and colony-forming units. *Eur. J. Immunol.* **9**, 853-859 (1979).
13. Crawford, J. M. and Goldschneider, I.: Thy-1 antigen and B lymphocyte differentiation in the rat. *J. Immunol.* **124**, 969-976 (1980).
14. Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265-275 (1951).
15. Hayman, M. J. and Crumpton, M. J.: Isolation of glycoproteins from pig lymphocyte plasma membrane using lens culinaris phytohemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 923-930 (1972).
16. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A., Shimogawara, I. and Kikuchi, K.: Immunohistochemical study of lymphocytes in rat pineal gland: Selective accumulation of T lymphocytes. *Anat. Rec.* 1981 In press.
17. Ishii, Y., Ueno, H. and Kikuchi, K.: Ultrastructure of lymphoid cells with surface-bound immunoglobulins in rats. *J. Reticuloendothel. Soc.* **15**, 155-162 (1974).
18. Graham, R. C. Jr. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291-302 (1966).
19. Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.: Preparation of iodine -131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**, 495-496 (1962).
20. Gahmberg, C. G. and Andersson, L. C.: Selective radioactive labelling of cell surface sialoglycoproteins by periodate-tritiated borohydride. *J. Biol. Chem.* **252**, 5888-5894 (1977).
21. Richard, J., Pink, L. and Ziegler, A.: Radio-labeling and immunoprecipitation of cell surface macromolecules. In *Immunological Methods*. Edited by I. Lefkovits and B. Pernis. 169-179, Academic Press, New York, San Francisco, and London (1979).
22. Cullen, S. E. and Schwarz, B. D.: An improved method for isolation of H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation induced by protein A bearing staphylococci. *J. Immunol.* **117**, 136-142 (1976).
23. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
24. Raff, M. C. and Wortis, H. H.: Thymus dependence of θ -bearing cells in the peripheral lymphoid tissue of mice. *Immunology* **18**, 931-942 (1970).
25. Trowbridge, I. S., Weissman, I. L. and Beavan, M. J.: Mouse T-cell surface glycoprotein recognized by heterologous anti-thymocyte sera and its relationship to Thy-1 antigen. *Nature* **256**, 652-654 (1975).
26. Zwerner, R. K., Bastad, P. A. and Acton, R. T.: Isolation and characterization of murine cell surface components. I. Purification for milligram quantities of Thy-1.1. *J. Exp. Med.* **146**, 986-1000 (1977).
27. Ishii, Y., Koshiba, H., Yamaoka, H. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte specific antigens and their cross reactivity with mouse T cells. *J. Immunol.* **117**, 497-503 (1976).
28. Williams, A. F., Barclay, A. N., Letarte-Muirhead, M. and Morris, R. T.: Rat Thy-1 antigens from thymus and brain: Their tissue distribution, purification and chemical composition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **41**, 51-61 (1976).
29. Acton, R. T., Morris, R. T. and Williams, A. F.: Estimation of the amount and tissue distribution of rat Thy-1.1 antigen. *Eur. J. Immunol.* **4**, 598-602 (1974).
30. Thierfelder, S.: Haemopoietic stem cells of rats but not of mice express Thy-1.1 alloantigen. *Nature* **269**, 691-698 (1977).
31. Goldschneider, I.: Antigenic relationship between bone marrow lymphocytes, cortical thymocytes and a subpopulation of peripheral T cells in the rat: Description of a bone marrow lymphocytes antigen. *Cell. Immunol.* **24**, 289-307 (1976).
32. Goldschneider, I.: Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. *J. Exp. Med.* **148**, 1351-1366 (1978).
33. Inokuchi, Y. and Nagai, Y.: Immunochemical characterization of mouse brain associated theta (Thy-1) antigen. *Mol. Immunol.* **16**, 791-796 (1979).

34. Letarte-Muirhead, M., Barclay, A. N. and Williams, A. F.: Purification of the Thy-1 molecule, a major cell-surface glycoprotein of rat thymocytes. *Biochem. J.* **151**, 685-697 (1975).
 35. Standring, R., McMaster, W. R., Sunderland, C. A. and Williams, A. F.: The predominant heavily glycoproteins at the surface of rat lymphoid cells are differentiation antigens. *Eur. J. Immunol.* **8**, 832-839 (1978).
 36. Trowbridge, I. S. and Mazauskas, C.: Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins. *Eur. J. Immunol.* **6**, 557-562 (1976).
 37. Barclay, A. N., Letarte-Muirhead, M., Williams, A. F. and Faulkes, R. A.: Chemical characterization of the Thy-1 glycoproteins from the membranes of rat thymocytes and brains. *Nature* **263**, 563-567 (1976).
 38. Zaluski, M. and Klein, J.: Genetic control of the immune response to Thy-1 antigens. *Immunol. Rev.* **38**, 120-162 (1978).
 39. Karre, K. and Seley, J. K.: Cytotoxic Thy-1.2-positive blasts with NK-like selectivity in murine mixed lymphocytes cultures. *J. Immunol.* **123**, 1511-1518 (1979).
 40. Mattes, M. J., Sharrow, S. O., Herberman, R. B. and Holden, H. T.: Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **123**, 2851-2860 (1979).
 41. Cantor, H., Kasai, M., Shen, F. W., Leclerc, J. C. and Glimcher, L.: Immunogenetic analysis of natural killer activity in the mouse. *Immunol. Rev.* **44**, 3-12 (1979).
 42. Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T. and Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* **16**, 230-239 (1975).
 43. Habu, S., Hayakawa, K., Okumura, K. and Tada, T.: Surface markers on natural killer cells of the mouse. *Eur. J. Immunol.* **9**, 938-942 (1979).
 44. Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tada, T.: A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **10**, 175-180 (1980).
 45. Schwarting, G. A. and Summers, A.: Gangliosyl ceramide is a T cell differentiation antigen associated with natural cell mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **124**, 1691-1694 (1980).
 46. Ritter, M. A., Gordon, L. K. and Goldschneider, I.: Distribution and identity of Thy-1 bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues. *J. Immunol.* **121**, 2463-2471 (1980).
-
- 別刷請求先: (〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学病理学第1講座 菊地浩吉